

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶: G01N 33/535, 33/58, C12Q 1/68, 1/34	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/10775 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. April 1995 (20.04.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/03379 (22) Internationales Anmeldedatum: 13. Oktober 1994 (13.10.94) (30) Prioritätsdaten: A 2071/93 15. Oktober 1993 (15.10.93) AT (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PITTNER, Fritz [AT/AT]; Khekgasse 40-42/11, A-1235 Wien (AT). SCHALKHAM- MER, Thomas [AT/AT]; A-3072 Kasten 105 (AT). ECKER, Bernhard [AT/AT]; Hintenbergerstrasse 130a, A-2551 Enzesfeld (AT). KYNCLOVA, Eva [CZ/AT]; Linzerstrasse 83/11, A-1140 Wien (AT). WAKOLBINGER, Werner [AT/AT]; Im Bäckerfeld 1, A-4061 Pasching (AT). (74) Anwälte: FOUQUET, Herbert usw.; Boehringer Mannheim GmbH, D-68298 Mannheim (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: LIPASE-LABELLED PROBE (54) Bezeichnung: LIPASE-MARKIERTE PROBE (57) Abstract <p>In order to improve the thermal and chemical stability of an enzyme-labelled probe, a lipase that is preferably extracted from <i>Candida rugosa</i> and whose isoenzymes or structural analogues have at least 70 % aminoacid homology and lipase activity is used as the enzyme.</p> (57) Zusammenfassung <p>Zur Verbesserung der thermischen und chemischen Stabilität einer mit Enzymmarkierten Probe wird der Einsatz von Lipase, welche bevorzugt aus <i>Candida rugosa</i> erhältlich ist, deren Isoenzymen oder strukturellen Analoga mit einer Aminosäurehomologie von wenigstens 70 % und Lipaseaktivität als Enzym verwendet.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

LIPASE-MARKIERTE PROBE

Die Erfindung betrifft eine mit Lipase markierte Probe oder Testsubstanz bzw. die Verwendung von Lipase für die Bestimmung von biologischem Material.

Für die Detektion von biologisch relevanten Gruppen, bestimmten Genen, Antigenen, Antikörpern, Bakterienoberflächenproteinen oder dgl., ist es bekannt geworden, Marker bzw. Testsubstanzen zu entwickeln, welche das Auffinden der gesuchten Stoffe erleichtern sollen.

Insbesondere im Bereich der Gentechnologie ist es bekannt, Gensonden radioaktiv zu markieren, wobei mit einer derartigen Gensonde nach komplementären Nukleinsäuren gesucht werden kann. Im Fall von mit Enzymen markierten Testsubstanzen wurde bisher als Enzym Peroxidase oder alkalische Phosphatase eingesetzt. Beide Enzyme zeichnen sich durch eine relativ gute Empfindlichkeit und eine relativ leichte Nachweisbarkeit aus, was ihre Eignung als Marker bzw. als Testsubstanz durchaus unterstreicht. Diese speziellen Enzyme sind jedoch mit Nachteilen verbunden. So sind beispielsweise Randbedingungen einzuhalten, welche die Verwendung derartiger Enzyme für den Nachweis bestimmter Substanzen unmöglich macht. Des weiteren ist die Haltbarkeit und Thermostabilität derartiger Enzyme begrenzt. Darüber hinaus erfordern derartige Enzyme das Arbeiten in einem exakt definierten Milieu, wodurch der Anwendung deutliche Grenzen gesetzt sind. Schließlich ist bei einer Reihe von Tests die Anwesenheit von Metallionen, wie sie beispielsweise bei dem Arbeiten mit alkalischer Phosphatase gefordert wird, für einen Nachweis hinderlich, wobei Metallionen komplexierende Substanzen wie EDTA nicht nur ein Arbeiten mit Phosphatase unmöglich machen, sondern gleichzeitig auch im Fall von Peroxidasen die Gefahr einer Denaturierung und damit eine wesentliche Verschlechterung der Nachweisgrenzen zur Folge hat.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine mit Enzym markierte Probe oder Testsubstanz zu schaffen, welche sich durch wesentlich verbesserte Stabilität und ein wesentlich verbreitertes Anwendungsspektrum auszeichnet und auf diese Weise Substanzen für eine analytische Bestimmung zugänglich macht, welche mit bisher mit Enzym markierten Proben oder Testsubstanzen in keiner Weise zugänglich waren.

Die Lösung dieser Aufgabe besteht im wesentlichen darin, daß als Enzym eine pflanzliche Lipase, deren Isoenzyme oder strukturelle Analoga mit einer Aminosäurehomologie von wenigstens 70 % und Lipaseaktivität verwendet wird. *Candida rugosa*, welche sich als Quelle besonders geeignet erwiesen hat, und in der Literatur auch als *Candida-Cylindracea* beschrieben ist, enthält eine Lipase, deren Struktur weitestgehend bestimmt ist. Die Klonierung und die Analyse der Lipasesequenz ist insbesondere in Gene 124:1 (Februar 14, 1993, Seiten 45-55) ausführlich beschrieben. Das Enzym wird hier als 57-kDa Protein mit 534 Aminosäuren angegeben, wobei 5 Isoenzyme mit einer Aminosäurehomologie von 80 % bereits strukturell aufgeklärt wurden. In jedem Fall handelt es sich um eine Lipase aus Pflanzen, insbesondere Pilzen. Besonders bevorzugt ist eine Lipase aus *Candida rugosa* DSM 2031. Die Verwendung dieser Lipase hat gegenüber allen bisher bekannten Enzymen, aber auch gegenüber anderen bekannten Lipasen, insbesondere tierischen Lipasen, eine wesentliche Verbesserung der Produkteigenschaften zur Folge. Insbesondere wurde herausgefunden, daß bei Verwendung der erfindungsgemäß vorgeschlagenen Lipase eine Thermostabilität bis wenigstens 60 °C sicher-gestellt ist, welche weder mit alkalischer Phosphatase noch mit Peroxidase erreicht werden kann. Insbesondere für Hybridisierungstests, bei denen die Anwendung erhöhter Temperatur für eine akzeptable Reaktionsgeschwindigkeit von wesentlicher Voraussetzung ist, wird durch die auf diese Weise erzielte Thermostabilität die Voraussetzung geschaffen, derartige Tests in einer vertretbaren Zeit durchführen zu können.

Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäß vorgeschlagenen Lipase besteht darin, daß sie für ihre Aktivität in keiner Weise Metallionen benötigt. Im Fall von alkalischer Phosphatase sind Magnesium- und Zinkionen Voraussetzung für die enzymatische Aktivität, und eben diese Metallionen würden beispielsweise Nukleasen aktivieren, welche in der Folge die Verwendung von alkalischer Phosphatase für Gensonden verhindern.

Um insbesondere bei der Verwendung von mit Enzym markierten Gensonden die Aktivierung von Nukleasen sicher zu verhindern, wird vielfach mit komplexierenden Substanzen, wie beispielsweise EDTA gearbeitet. EDTA komplexiert nicht nur Metallionen und erlaubt auf diese Weise nicht mehr die Verwendung von alkalischer Phosphatase, vielmehr haben entsprechend große Mengen von EDTA auch die Tendenz, Proteine zu denaturieren. Die erfindungsgemäß vorgeschlagene Lipase hat sich nicht nur durch wesentlich höhere Thermostabilität als bekannte Enzyme ausgezeichnet, sondern zeichnet sich auch durch eine völlige Stabilität gegen EDTA aus. Eine weitere, deutliche Überlegenheit der erfindungsgemäß verwendbaren Lipasen gegenüber bekannten Enzymen besteht darin, daß auch Harnstoff bzw. entsprechende Derivate in großen Mengen die Funktion der Lipase in keiner Weise beeinträchtigen. Bei Verwendung von Lipase kann zum Schutz von SH-Gruppen mit EDTA gearbeitet werden, was mit bisherigen mit Enzym markierten Proben oder Testsubstanzen in keiner Weise möglich war.

Die erfindungsgemäß verwendbaren Lipasen zeichnen sich auch durch eine wesentlich verbesserte Verträglichkeit gegenüber organischen Lösungsmitteln aus. Insbesondere sind die erfindungsgemäß vorgeschlagenen Lipasen auch in Toluol einsetzbar, wodurch sich die analytische Anwendungsbreite der erfindungsgemäßen Proben oder Testsubstanzen wesentlich erhöht.

Die hohe Stabilität erlaubt die analytische Verwendbarkeit der erfindungsgemäßen Proben und Testsubstanzen in einem pH-Bereich zwischen 2,5 und 9, wobei die Unempfindlichkeit gegenüber Harnstoffen den Nachweis hochhydrophober Substanzen ermöglicht. Die Verwendung von großen Mengen von beispielsweise Harnstoff, welche mit anderen mit Enzym markierten Proben oder Testsubstanzen nicht zulässig wäre, ermöglicht darüber hinaus, die Sekundärstruktur einer DNA soweit aufzuweiten, daß die Zuverlässigkeit von Gensonden wesentlich verbessert wird.

Aufgrund der wesentlich höheren Stabilität der erfindungsgemäß vorgeschlagenen Lipase bestehen auch kaum Grenzen bezüglich der Art der Koppelung an reaktive Substanzen und insbesondere biorekognitive Gruppen.

Lipasekonjugate können aufgrund ihrer hohen Stabilität getrocknet und bei Raumtemperatur gegebenenfalls lyophilisiert oder auch nur luftgetrocknet über Jahre ohne Aktivitätseinbuße gelagert werden. Insgesamt ergibt sich gegenüber bekannten mit Enzymen markierten Proben eine Umsatzrate in gleicher Größenordnung bei gleichzeitig verbesserter Empfindlichkeit, die auf die verbesserte Nachweisbarkeit der Lipase zurückzuführen ist.

Während beispielsweise im Vergleichsversuch mit alkalischer Phosphatase eine Nachweisgrenze bei etwa 250 bis 100 pg vorliegt, haben Versuche ergeben, daß sich Lipase noch in einem Bereich bis etwa 5 pg exakt bestimmen läßt, wobei bis in einem Bereich von 10 ng neben einer rein qualitativen Analyse sogar eine weitestgehend einfache Abschätzung der Menge möglich ist.

Die Bestimmung der Lipase kann in üblicher Weise erfolgen, wofür beispielsweise Ester von Phenolen oder deren Derivate als Substrate eingesetzt werden können. Die auf diese Weise erzielte Farbreaktion läßt eine unmittelbare und einfache Auswertung zu. Entsprechende Methoden sind dem Fachmann bekannt.

Insbesondere im Zusammenhang mit Oligonucleotidsonden zeigen sich die Stabilitätsvorteile der erfindungsgemäßen Lipase besonders deutlich.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung ist die Probe oder Testsubstanz dadurch gekennzeichnet, daß die Lipase mit Biotin, Avidin, Leichthin, Protein A, Protein G, Antikörperbindenden Proteinen, Antikörpern, Antigenen, viralen Proteinantigenen, Bakterienoberflächenproteinen, Digoxigenin, DNS, RNS, Oligonucleotiden oder synthetischen Analoga Metallkolloiden oder Kunststoffmikropartikel ($< 5 \mu\text{m}$) konjugiert ist. Derartige Konjugate weisen für eine weite Anwendungsbreite bestimmte reaktive Gruppen und im besonderen biorekognitive Gruppen auf, welche damit ein überaus großes Einsatzgebiet für derartige markierte Proben oder Testsubstanzen eröffnen.

Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung von Lipase aus Pflanzen, insbesondere aus *Candida rugosa* DSM 2031, deren Isoenzyme oder strukturelle Analoga mit einer Aminosäurehomologie von wenigstens 70 % und Lipase-aktivität zur Herstellung von analytischen Proben oder Testsubstanzen, wobei die Lipase mit biorekognitiven Gruppen konjugiert eingesetzt wird und wobei derartige Testsubstanzen sich ganz besonders für Bioassays, Teststreifen, Biosensoren oder als Gensonden eignen. Als Gensonden können hierbei im besonderen klassische Oligonucleotidproben eingesetzt werden, welche aufgrund der günstigen Thermostabilität der Lipase eine selektive Hybridisierung unter Anwendung stringenter Bedingungen zulassen.

Die Überlegenheit der erfindungsgemäß vorgeschlagenen pflanzlichen Lipase, insbesondere aus *Candida rugosa* bzw. ihrer Isoenzyme sowie der eingangs genannten strukturellen Analoga wird anhand der folgenden Abbildungen und Beispiele näher erläutert.

Abb. 1 zeigt die Thermostabilität der Lipase der *Candida*spezies. Es ist ersichtlich, daß die Aktivität bei einem pH-Wert von 5 bei Temperaturen von 50 °C über die Zeit nahe zu konstant verläuft und bei einem pH-Wert von 7 auch nach über einer Stunde noch über 75 % der ursprünglichen Aktivität beibehält. Selbst bei Temperaturen von 60 °C und einem pH-Wert von 5 bleiben Werte in der Größenordnung von 80 % der ursprünglichen Aktivität nach einer Stunde erhalten.

Abb. 2 zeigt die Nachweisgrenzen bei Farbreaktionen von Lipase und alkalischer Phosphatase. Es ist ersichtlich, daß bei alkalischer Phosphatase bei etwa 250 pg die Nachweisgrenze weitestgehend erreicht ist, wohingegen im Original bei Lipase noch bei 5 pg ein Punkt als Farbreaktion detektiert werden konnte. Die Durchmesser der Punkte bleiben bei Lipase bis in einem Bereich von 10 ng weitestgehend korreliert mit der tatsächlichen Menge, wohingegen eine einfache quantitative Abschätzung bei alkalischer Phosphatase ab etwa 500 pg schon nicht mehr ohne weiters möglich ist.

In Abb. 3 ist die Verwendung von Lipase für eine Oligonucleotidsonde schematisch nach Art eines Flußdiagrammes verdeutlicht. Bei der Verfahrensweise wird an eine Mikrotiterplatte 1 über eine Biotin-Avidin-Kopplung ein strukturelles Gen 2 immobilisiert. Mit Lipase 3 wird eine Oligonucleotidsonde 4 verbunden, wobei bei einem Ana-lyten 5 dann eine Festlegung der Lipase an der Mikrotiterplatte erfolgt, wenn dieser Ana-lyt sowohl mit dem Gen, welches an der Mikrotiterplatte 1 festgelegt ist, als auch mit dem Oligonucleotid 4 rekombiniert. Insgesamt ergibt sich auf diese Weise bei Anwesenheit einer bestimmten zu detektierenden biologischen Substanz 5 durch die Hybridisierungsreaktion eine Immobilisierung der Lipase 3 an der Mikrotiterplatte 1. Der qualitative Nachweis gelingt in der Folge durch konventionelle Methoden, beispielsweise durch eine Farbreaktion der Lipase mit einem entsprechenden Substrat als Reagenz.

Abb. 4 zeigt einen Vergleich der optimalen pH-Werte von Lipase, Peroxidase und alkalischer Phosphatase.

Abb. 5 zeigt einen Vergleich von Farbstoff-Präzipitationsassays für Lipase und alkalische Phosphatase.

Beispiele

Allgemeine Vorschriften

Meerrettich-Peroxidase-Aktivitätsassay unter Verwendung von ABTS

Prinzip:

Meerrettich-Peroxidase wurde spektrophotometrisch bei 23 °C nachgewiesen, durch Verfolgen der Oxidationsrate von ABTS (1,49 mM) im Gegenwart von Wasserstoff-peroxid (0,045 %) in 0,1 M Citrat-/Phosphatpuffer, pH 4,5, bei einer Wellenlänge von 420 nm.

Beschreibung der Methode:

Es wurde eine Substrat-Mischung aus 0,5 ml ABTS (20 mg/10 ml Wasser), 1 ml Wasserstoffperoxid (0,6 % in Wasser) und 9,5 ml 0,1 M Citrat-/Phosphatpuffer, pH 4,5, hergestellt.

50 µl einer Enzymlösung wurden mit 500 µl der oben genannten Substratlösung vermischt und die Kinetik der enzymatischen Reaktion bei einer Wellenlänge von 420 nm über einen Zeitraum von einer Minute verfolgt. Die Konzentration des oxidierten Substrats wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für ABTS berechnet. Die Konzentration der Enzymlösung wurde so eingestellt, daß ein linearer Verlauf der Extinktionskurve unter Arbeitsbedingungen gewährleistet war.

Bestimmung der Aktivität Alkalischer Phosphatase mit p-Nitrophenylphosphate als Substrat

Prinzip:

Alkalische Phosphatase wurde spektrophotometrisch bei 23 °C nachgewiesen durch Verfolgen der Hydrolyse von 0,1 mM p-Nitrophenylphosphat in 0,1 M TRIS, 0,1 M NaCl und 50 mM MgCl₂, pH 8,5, bei einer Wellenlänge von 405 nm [Lazdunski, C. and Lazdunski, M. (1966) BBA 113, 551-566].

Beschreibung der Methode:

5 µl einer Enzymlösung wurden mit 500 µl 0,1 M TRIS, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 8,5, gemischt. Nach Zugabe von 100 µl einer 0,6 mM p-Nitrophenylphosphatlösung, wurde der Reaktionsverlauf bei 405 nm kinetisch über einen Zeitraum von einer Minute verfolgt. Die Konzentration der Enzymlösung wurde so eingestellt, daß ein linearer Verlauf der Extinktionskurve unter Arbeitsbedingungen gewährleistet war. Die Konzentration des hydrolysierten Substrats wurde mit Hilfe einer p-Nitrophenol-Eichkurve bei pH = 8,5 bestimmt.

Bestimmung der Lipase-Aktivität mit p-Nitrophenylbutyrat

Prinzip:

Lipase wurde spektrophotometrisch bei 23 °C nachgewiesen durch Verfolgen der Hydrolyse von 0,1 mM p-Nitrophenylbutyrat in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Beschreibung der Methode:

Eine Stammlösung von p-Nitrophenylbutyrat (PNPB) wurde durch Vermischen von 23 µl PNPB mit 5 ml 1 % Polyvinylalkohol in Wasser unter heftigem Schütteln hergestellt. Die Phase mit ungelöstem PNPB wurde durch Zentrifugation (4 °C, 1500 g, 7 min) abgetrennt.

Die Konzentration der verbleibenden wäßrigen Lösung von pNPB wurde mit Hilfe einer Eichkurve von p-Nitrophenol bei pH = 7,0 bestimmt.

5 µl Enzymlösung wurden mit 500 µl 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, vermischt. Nach Zugabe von 100 µl der 0,6 mM p-Nitrophenylbutyratlösung wurde die Kinetik der Reaktion bei einer Wellenlänge von 405 nm über einen Zeitraum von 1 Minute verfolgt. Die Konzentration der Enzymlösung wurde so eingestellt, daß ein linearer Verlauf der Extinktionskurve unter Arbeitsbedingungen gewährleistet war. Die Konzentration des hydrolysierten Substrats wurde mit Hilfe einer p-Nitrophenol-Eichkurve bei pH = 7,0 bestimmt.

Vorbehandlung der Lipase:

Röntgenkristallographische Studien diverser Lipasen zeigten, daß das aktive Zentrum eine Rille darstellt, die von einem helikalen Proteinteil deckelartig abgedeckt wird [Schräg, J. D. and Cygler, M., J. Mol. Biol. 230, 575-591 (1993); Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M. and Derewenda, Z. S., Biochemistry 31, 1532-1541 (1992)]. Diverse Effektoren sind in der Lage, eine extensive räumliche Umstrukturierung herbeizuführen, wobei das aktive Zentrum für das Substrat freier zugänglich wird.

Lipase (mit einer Proteinkonzentration von 0,09 mg/ml; bestimmt mittels Bradford-Methode) wurde 1 bis 60 min lang inkubiert mit einer 20 bis 44 % (v/v) Effektorlösung (z. B. Tetrahydrofuran, 2-Methyl-pentandiol, 2-Isopropanol...) in 0,1 M Acetatpuffer, 0,1 % an BSA, pH 5,0 bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Enzymlösung auf eine meßfähige Konzentration verdünnt mit 0,1 M Acetatpuffer, pH 5,0, 0,1 % an BSA, oder 0,2 % (v/v) an Tween-20 in 0,1 M Acetatpuffer, pH 5,0, 0,1 % an BSA. Die Proben wurden bei 4 °C aufbewahrt. Die Aktivität wurde mit Hilfe des pNPB-Assays bestimmt.

Bestimmung der Lipaseaktivität mit Hilfe von Hydrochinonmonobutyrat

Prinzip:

Lipase wurde spektrophotometrisch bei 23 °C durch Verfolgen der Hydrolyse von 0,38 mM Hydrochinonmonobutyrat in 0,1 M Puffer pH = 1,5 bis 9,0 bei einer Wellenlänge von 295 nm nachgewiesen.

Beschreibung der Methode:

Eine Stammlösung von Hydrochinonmonobutyrat (HMB) wurde durch Vermischen von 10 mg HMB in 6 ml einer 1 % wäßrigen Polyvinylalkohollösung unter heftigem Schütteln hergestellt. Die Konzentration der HMB-Lösung wurde mit Hilfe einer Hydrochinon-Eichkurve festgestellt und betrug 3,08 mmol/l.

20 µl einer Enzymlösung wurden zu 700 µl 0,1 M Puffer, der auf den gewünschten pH-Wert eingestellt war, zugegeben. Nach Zugabe von 100 µl einer 3,08 mM HMB-Lösung wurde die Kinetik der enzymatischen Reaktion bei einer Wellenlänge von 295 nm über einen Zeitraum von 2 min verfolgt. Die Konzentration der Enzymlösung wurde so eingestellt, daß ein linearer Verlauf der Extinktionskurve unter Arbeitsbedingungen gewährleistet war. Die Konzentration an hydrolysiertem Substrat wurde mit Hilfe einer Hydrochinon-Eichkurve bestimmt.

Beispiel 1:**Vergleich der spezifischen Aktivitäten von Lipase und Alkalischer Phosphatase mit Hilfe von p-Nitrophenylbutyrat bzw. p-Nitrophenylphosphat**

1. gereinigte Meerrettich-Peroxidase 1050 µmol/min · mg
(ABTS, pH = 4,5, 23 °C)
2. gereinigte Alkalische Phosphatase 900 µmol/min · mg
(p-Nitrophenylphosphat, pH = 8,5, 23 °C)
3. Rohpräparation einer Lipase aus *Candida rugosa* 2700 µmol/min · mg
(p-Nitrophenylbutyrat, pH = 7,0, 23 °C)

Die Aktivität wurde auf die Totalproteinkonzentration der enzymatischen Roh-präparation bezogen.

Bei gereinigten Lipase-Isoenzymen ist eine signifikante Erhöhung der spezifischen Aktivität zu erwarten.

Beispiel 2:**Bestimmung und Vergleich der pH-Optima von Lipase, Meerrettich-Peroxidase und Alkalischer Phosphatase**

Die Lipaseaktivität wurde bei unterschiedlichen pH-Werten mit Hilfe des Hydrochinon-Assays bestimmt. Das Enzym Lipase besitzt ein sehr breites pH-Optimum (zwischen pH 3 - 8) und ist daher für gekoppelte Enzymassays (z. B. mit Peroxidase) geeignet. Alkalische Phosphatase ist bei pH-Werten über 7 aktiv, Meerrettich-Peroxidase besitzt ein pH-Optimum um pH = 5, wenn ABTS als Substrat verwendet wird (Abb. 4).

Beispiel 3:**Stabilität von Lipase, Meerrettich-Peroxidase und Alkalischer Phosphatase gegenüber EDTA**

Alle oben erwähnten Enzyme wurden in Gegenwart von 50 mM EDTA bei 4 °C inkubiert. Alle gemessenen Enzymkonzentrationen wurden auf einen Proteingehalt von 20 nmol eingestellt.

- Meerrettich-Peroxidase wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,5, 0,05 % an BSA, bestimmt.
- Alkalische Phosphatase wurde mit 50 mM TRIS-Puffer, pH 7,6, 1 mM an $MgCl_2$ und 0,1 mM an $ZnCl_2$, 0,05 % an BSA, verdünnt.
- Lipase wurde mit 0,1 M Acetatpuffer, pH 5,0, 0,05 % an BSA, verdünnt.

Tabelle 1

	t = 0 min	t = 30 min	t = 16 Std.
Lipase	100 %	100 %	100 %
Alkalische Phosphatase	100 %	< 14 %	< 4 %
Peroxidase	100 %	100 %	100 %

Beispiel 4:**Thermostabilität von Lipase, Meerrettich-Peroxidase und Alkalischer Phosphatase bei 50 °C**

Der Vergleich der Thermostabilität der oben angeführten Enzyme wurde bei einer Proteinkonzentration von 0,2 mg/ml durch Inkubation bei 50 °C während einer Zeitspanne von 120 min durchgeführt.

- Meerrettich-Peroxidase wurde in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,5, inkubiert.
- Alkalische Phosphatase wurde in 50 mM TRIS, 1 mM MgCl₂ und 0,1 mM ZnCl₂, pH 7,6, inkubiert.
- Lipase wurde mit 0,1 M Acetatpuffer, pH 5,0, 0,5 % an BSA, verdünnt.

Tabelle 2

	t = 0 min	t = 30 min	t = 90 min	t = 120 min
Lipase	100 %	100 %	100 %	89 %
Alkalische Phosphatase	100 %	100 %	96 %	87 %
Peroxidase	100 %	90 %	82 %	75 %

Beispiel 5:**Stabilität von Lipase, Meerrettich-Peroxidase (HRP) und Alkalischer Phosphatase in Gegenwart von Azid-Ionen**

Alle oben genannten Enzyme wurden in Gegenwart von 0,05 % Natriumazid bei 25 °C und 4 °C inkubiert. Um diese Enzyme miteinander zu vergleichen, wurden äquivalente molare Proteinkonzentrationen von 20 nmol/ml verwendet.

- Meerrettich-Peroxidase (HRP) wurde verdünnt mit 0,1 M Phosphatpuffer, 0,5 % BSA, pH 7,5.
- Alkalische Phosphatase wurde verdünnt mit 50 mM TRIS, 1 mM MgCl₂ und 0,1 mM ZnCl₂, 0,05 % BSA, pH 7,6.
- Lipase wurde verdünnt mit 0,1 M Acetatpuffer, 0,05 % BSA, pH 5,0.

Azide können zur Konservierung aller oben genannten Enzyme verwendet werden. In Bezug auf Alkalische Phosphatase wurde eine geringfügige Abnahme der Enzymaktivität (10 - 20 % pro Tag) beobachtet. Außerdem führt Azid zur Verringerung der Peroxidaseaktivität, indem es Peroxidase (HRP) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid inaktiviert (während des Assays).

Beispiel 6:

Stabilität von Lipase, Meerrettich-Peroxidase und Alkalischer Phosphatase in Gegenwart von 7 M Harnstofflösungen

Alle oben angeführten Enzyme wurden in Lösungen mit 7 M Harnstoff bei 25 °C und 4 °C inkubiert. Um diese Enzyme zu vergleichen, wurden Proteinkonzentrationen von 0 nmol/ml verwendet.

- Peroxidase (HRP) wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5), 0,05 % BSA, verdünnt.
- Alkalische Phosphatase wurde mit 50 mM TRIS (pH 7,6), 1 mM MgCl₂ und 0,1 mM ZnCl₂, 0,05 % BSA, verdünnt.
- Lipase wurde mit 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,0), 0,05 % BSA, verdünnt.

Bei 4 °C führt 7 M Harnstofflösung nur zur geringfügigen Denaturierung aller oben genannten Enzyme (10 % Aktivitätsabnahme pro Tag). Bei 25 °C nimmt die Aktivität dieser Enzyme um 50 % ab.

Beispiel 7:

Einführung von Sulfhydryl-Gruppen (-SH) in Lipase (zur Kopplung an Reporter-Moleküle die Maleimid-oder Iodacetat-Gruppen enthalten)

Die Einführung von Thiol-Gruppen in Lipase wurde durchgeführt in 0,1 M EDTA, 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,5 bei einer Protein-Endkonzentration von 3 mg/ml unter Verwendung eines zehnfachen Überschusses an 2-Iminoethanol.

Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur, wurde überschüssiges 2-Iminoethanol durch Ultrafiltration mit Centricon-30-Röhrchen vom modifizierten

Enzym abgetrennt. Das Ausmaß der Modifizierung wurde unter Verwendung von Ellman's Reagenz [5,5'-Dithio-Bis-(2-Nitro-benzoesäure)] bestimmt. Das mit SH-Gruppen modifizierte Protein wurde in 0,1 M EDTA, 0,1 M Acetatpuffer, pH 5 bei 4 °C gelagert.

Beispiel 8:

Einführung von Maleimid-Resten in Lipase mittels heterobifunktionaler Crosslinker (zur Kopplung an Reporter-Moleküle, die Thiol-Gruppen enthalten)

(Sulfo)succinimidyl-4-(N-maleimidomethylcyclohexan); (PIERCE 22322X)
m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid-ester; (PIERCE 22312X)
(Sulfo)succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat; (PIERCE 22317X)
(Sulfo)succinimidyl-(4-iodoacetyl)aminobenzoat; (PIERCE 22327X)

Oben angeführte und kommerziell verfügbare heterobifunktionelle Crosslinker, die mindestens zwei verschiedene reaktive Gruppen besitzen, erlauben sequentielle Konjugationen und minimieren eine unerwünschte Polymerisation oder Selbst-Konjugation. Diese Crosslinker wurden wie folgt getestet:

Die Modifizierung von Lipase mit den angeführten Crosslinkern wurde durchgeführt in 50 mM Borat-Puffer, 0,1 M EDTA, pH = 7, mit einem 50 molaren Überschuß an heterobifunktionellem Crosslinker. Die Proteinkonzentration der Lipase-Fraktion wurde mittels Bradford-Test bestimmt und betrug 3 mg/ml. Die Lipase zeigte keinen nennenswerten Verlust an Enzymaktivität.

Beispiel 9:

Kopplung von Lipase und Polyethylenglycol

Prinzip:

Die Carboxyl-Gruppen der Lipase wurden in Gegenwart von Polyethylenglycol, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimide (NHS) modifiziert.

Beschreibung der Methode:

Modifizierte Lipase mit isoelektrischen Punkten $pI = 5,5$ bis $pI = 7,0$

Eine Stock-Lösung von 0,0'-Bis-(2-aminopropyl)polyethylenglykol 1900 (M.W. 2000) (DiaminoPEG) wurde in einer Konzentration von 0,59 g/ml in Wasser zubereitet und mit verdünnter Salzsäure auf $pH = 4,6$ eingestellt.

Eine Stock-Lösung von EDC/NHS wurde hergestellt, indem eine wäßrige Lösung von EDC mit einer Lösung von NHS in Dimethylformamid (DMF) im molaren Verhältnis 15:1 gemischt wurde. Diese Stock-Lösung wurde sofort verwendet.

Lipase (384 μg ; 6,7 nmol) wurde mit einer Lösung von DiaminoPEG (12,2 mg, 6,4 μmol) gemischt. Danach wurde eine Mischung von EDC/NHS (EDC: 0,15 mg, 780 nmol; NHS: 0,006 mg, 52 nmol) zugegeben und die Mischung 16 Stunden lang bei 4 °C in der Dunkelheit inkubiert (pH der Reaktionsmischung war 6,8). Die Protein-Endkonzentration betrug 5 mg/ml. Die Reaktion wurde mit 500 mM Acetatpuffer, pH 5 gestoppt, und der Überschuß an DiaminoPEG wurde mittels Elektrodialyse gegen 50 mM Acetatpuffer, pH 5,0, abgetrennt. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem nativen Polyacrylamid-Gel analysiert und unter Färbung mit Indolylacetat/Nitro-blue-Tetrazolium-Salz (NBT) detektiert.

Modifizierte Lipase mit isoelektrischen Punkten von $pI = 7$ bis $pI = 9$

Eine Stock-Lösung von 0,0'-Bis-(2-aminopropyl)polyethylenglykol 1900 (M.W. 2000) (DiaminoPEG) wurde in einer Konzentration von 0,59 g/ml in Wasser zubereitet und mit verdünnter Salzsäure auf $pH = 4,6$ eingestellt.

Eine Stock-Lösung von EDC/NHS wurde hergestellt, indem eine wäßrige Lösung von EDC mit einer Lösung von NHS in Dimethylformamid (DMF) im molaren Verhältnis 15:1 gemischt wurde, Diese Stock-Lösung wurde sofort verwendet.

Lipase (384 μg ; 6,7 nmol) wurde mit einer Lösung von DiaminoPEG (12,2 mg, 6,4 μmol) gemischt. Danach wurde eine Mischung von EDC/NHS (EDC: 0,61 mg, 3,2 μmol ; NHS: 0,024 mg, 0,21 μmol) zugegeben und die Mischung 16 Stunden lang bei 4 °C in der Dunkelheit inkubiert (pH der Reaktionsmischung war 6,8). Die Protein-Endkonzentration betrug 5 mg/ml. Die Reaktion wurde mit 500 mM Acetatpuffer, pH 5 gestoppt, und der Überschuß an DiaminoPEG wurde mittels Elektrodialyse gegen 50 mM Acetatpuffer, pH 5,0,

abgetrennt. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem nativen Polyacrylamid-Gel analysiert und unter Färbung mit Indolylacetat/Nitro-blue-Tetrazolium-Salz (NBT) detektiert.

Modifizierte Lipase mit isoelektrischen Punkten von pI = 7 bis pI = 9

Eine Stock-Lösung von 0,0'-Bis-(2-aminopropyl)polyethylenglykol 1900 (M.W. 2000) (DiaminoPEG) wurde in einer Konzentration von 0,59 g/ml in Wasser zubereitet und mit verdünnter Salzsäure auf pH = 4,6 eingestellt.

Eine Stock-Lösung von EDC/NHS wurde hergestellt, indem eine wäßrige Lösung von EDC mit einer Lösung von NHS in Dimethylformamid (DMF) im molaren Verhältnis 15:1 gemischt wurde, Diese Stock-Lösung wurde sofort verwendet.

Lipase (384 µg; 6,7 nmol) wurde mit einer Lösung von DiaminoPEG (12,2 mg, 6,4 µmol) gemischt. Danach wurde eine Mischung von EDC/NHS (EDC: 0,61 mg, 3,2 µmol; NHS: 0,024 mg, 0,21 µmol) zugegeben und die Mischung 16 Stunden lang bei 4 °C in der Dunkelheit inkubiert (pH der Reaktionsmischung war 6,8). Die Protein-Endkonzentration betrug 5 mg/ml. Die Reaktion wurde mit 500 mM Acetatpuffer, pH 5 gestoppt, und der Überschuß an DiaminoPEG wurde mittels Elektrodialyse gegen 50 mM Acetatpuffer, pH 5,0, abgetrennt. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem nativen Polyacrylamid-Gel analysiert und unter Färbung mit Indolylacetat/Nitro-blue-Tetrazolium-Salz (NBT) detektiert.

Beispiel 10:

Kopplung von Lipase an Desoxyoligonucleotide

Modifikation von Lipase (modifiziert mit Polyethylenglykol) mit SMCC:

Die Modifikation von PEG-Lipase wurde durchgeführt in 20 mM Phosphatpuffer, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei einer Protein-Endkonzentration von 10 mg/ml unter Verwendung eines 20fachen molaren Überschusses an SMCC (in Bezug auf fünf zu modifizierende Aminogruppen). Nach Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur und in der Dunkelheit wurde der überschüssige Crosslinker auf einer Sephadex-10-Säule, die zuvor mit 20 mM Phosphatpuffer + 2 mM EDTA (pH 6,5) äquilibriert wurde, abgetrennt.

Die gewünschten Fraktionen an Lipaseaktivität wurden mit Hilfe von Centricon-30-Röhrchen bei einer Raumtemperatur von 4 °C konzentriert und anschließend lyophilisiert. Die modifizierte Lipase wurde bei - 20 °C aufbewahrt und direkt für die Kopplung mit Oligonucleotiden verwendet.

Darstellung von SH-Oligonucleotiden:

Die Oligonucleotiden wurden mit der Phosphoramidit-Methode synthetisiert. Die 3'-terminale Sulfhydryl-Gruppe am 5'-Ende wurde während des letzten Syntheseschrittes mit C6-Thiol-Modifiern eingeführt. Nach Reinigung an einer Reverse Phase HPLC (01, M Triethylammoniumacetat, pH 7 und Methanol als mobile Phase), wurde die Trityl-Gruppe unter Verwendung von Silber-Nitrat abgespalten und in DTT bei - 20 °C aufbewahrt [Arbeitsvorschrift von Clontech].

Kopplung von SMCC-Lipase und Desoxyoligonucleotiden:

5 µg von Trityl-freiem Oligonucleotid in einem Volumen von 50 µl wurde über eine Sephadex G-25-Säule entsalzt und direkt mit dem lyophilisierten Enzym vermengt.

Nachdem sich das Enzym gelöst hatte, wurde die Reaktion zuerst eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend zur Vervollständigung der Reaktion 16 Stunden lang bei 4 °C ausgeführt.

Beispiel 11:

Immobilisierung von Lipase und Antigen an Metallkolloiden

Die Synthese von kolloidalem Gold wurde nach Frens, G. et al. [Nature Lond. Phys.Sci. 241, 20 (1973)] durchgeführt. Lipase (10 µl, Proteinkonzentration von 1 mg/ml) in 0,1 M Phosphatpuffer und 6 µl virales Antigen (0,8 mg/ml) wurden mit einem Milliliter kolloidaler Goldlösung gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die ungebundenen Proteine wurden durch 15minütige Zentrifugation bei 1600 g entfernt. Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt, und der Niederschlag wurde in 1000 µl 10 % Polyethylenglykol 20000 (PEG 20000) (Polyscience) gelöst. Jeder Lösungsschritt benötigte 50 µl 10 % SDS und den Einsatz von Ultraschall (Bandelin SONOREX Sper RK510II) über einige Minuten. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt.

Nach der letzten Zentrifugation wurde der Niederschlag in 50 µl 1 % PEG 20000 und 200 µl PBST-3 % BSA aufgelöst. Die Überstände und die gelösten Niederschläge wurden auf Lipaseaktivität und Antigenaktivität hin untersucht. Nur der erste Überstand zeigte Lipaseaktivität und repräsentiert hiermit ungebundene Proteine. Nach den übrigen Zentrifugationsschritten konnte keine Enzymaktivität in den Überständen gefunden werden. Die gelösten Niederschläge zeigten hingegen, wie erwartet, Lipaseaktivität.

Beispiel 12:

Vergleich von Farbstoff-Präzipitationsassay für Lipase und Alkalische Phosphatase

Präzipitationsassay mit Lipase:

Substrat-Stocklösung: 50 mg Indolylacetat in 1 ml 100 % Dimethylformamid (DMF); Stocklösung von Nitro-blue-Tetrazoliumchlorid (NBT); 50 mg NBT gelöst in 1 ml 70 % Dimethylformamid. Die Substratlösung wurde hergestellt durch Mixen von 66 µl NBT-Stocklösung in 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,5. Die Mischung wurde sofort verwendet.

Präzipitationsassay mit Alkalischer Phosphatase:

Substrat-Stocklösung: 50 mg 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) gelöst in 1 ml 100 % Dimethylformamid (DMF); NBT-Stocklösung: 50 mg NBT gelöst in 1 ml 70 % Dimethylformamid (DMF). Die Substratlösung wurde hergestellt durch Mixen von 33 µl Substrat-Stocklösung und 66 µl NBT-Stocklösung in 10 ml 0,1 M Substratpuffer (0,1 M TRIS, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 8,5). Die Mischung wurde sofort verwendet.

Jedenfalls kommt es bei hohen Konzentrationen durch die geringe Löslichkeit des Lipase-Reaktionsproduktes zu einer besseren Auflösung (Abb. 5).

Die Lipase, die in diesem Fall verwendet wurde, war nicht optimal aufgereinigt. Daher kann mit vorgereinigter und vorbehandelter Lipase ein besseres Detektionslimit erzielt werden.

- Patentansprüche -

1. Enzym-markierte Probe oder Testsubstanz, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine pflanzliche Lipase, ein entsprechendes Isoenzym oder ein strukturelles Derivat mit einer Aminosäurehomologie von wenigstens 70 % und Lipaseaktivität ist.
2. Enzym-markierte Probe bzw. Testsubstanz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Lipaseaktivität aufweisende Enzym aus *Candida rugosa* DSM 2031 erhältlich ist.
3. Enzym-markierte Probe oder Testsubstanz nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipase mit Biotin, Avidin, Lecithin, Protein A, Protein G, Antikörper-bindenden Proteinen, Antikörpern, Antigenen, viralen Proteinantigenen, Bakterienoberflächenproteinen, Digoxigenin, DNS, RNS, Oligonucleotiden oder synthetischen Analoga Metallkolloiden oder Kunststoffmikropartikel ($< 5 \mu\text{m}$) konjugiert ist.
4. Verwendung von pflanzlicher Lipase, deren Isoenzyme oder strukturelle Analoga mit einer Aminosäurehomologie von wenigstens 70 % und Lipaseaktivität zur Herstellung von analytischen Proben oder Testsubstanzen, wobei die Lipase mit bio-rekognitiven Gruppen konjugiert eingesetzt wird.
5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Lipase aus *Candida rugosa* DSM 2031 erhältlich ist.
6. Verwendung nach Anspruch 4 oder 5, zur Herstellung von Testsubstanzen für Bio-assays, Teststreifen, Biosensoren oder Gensonden.

Abb. 7

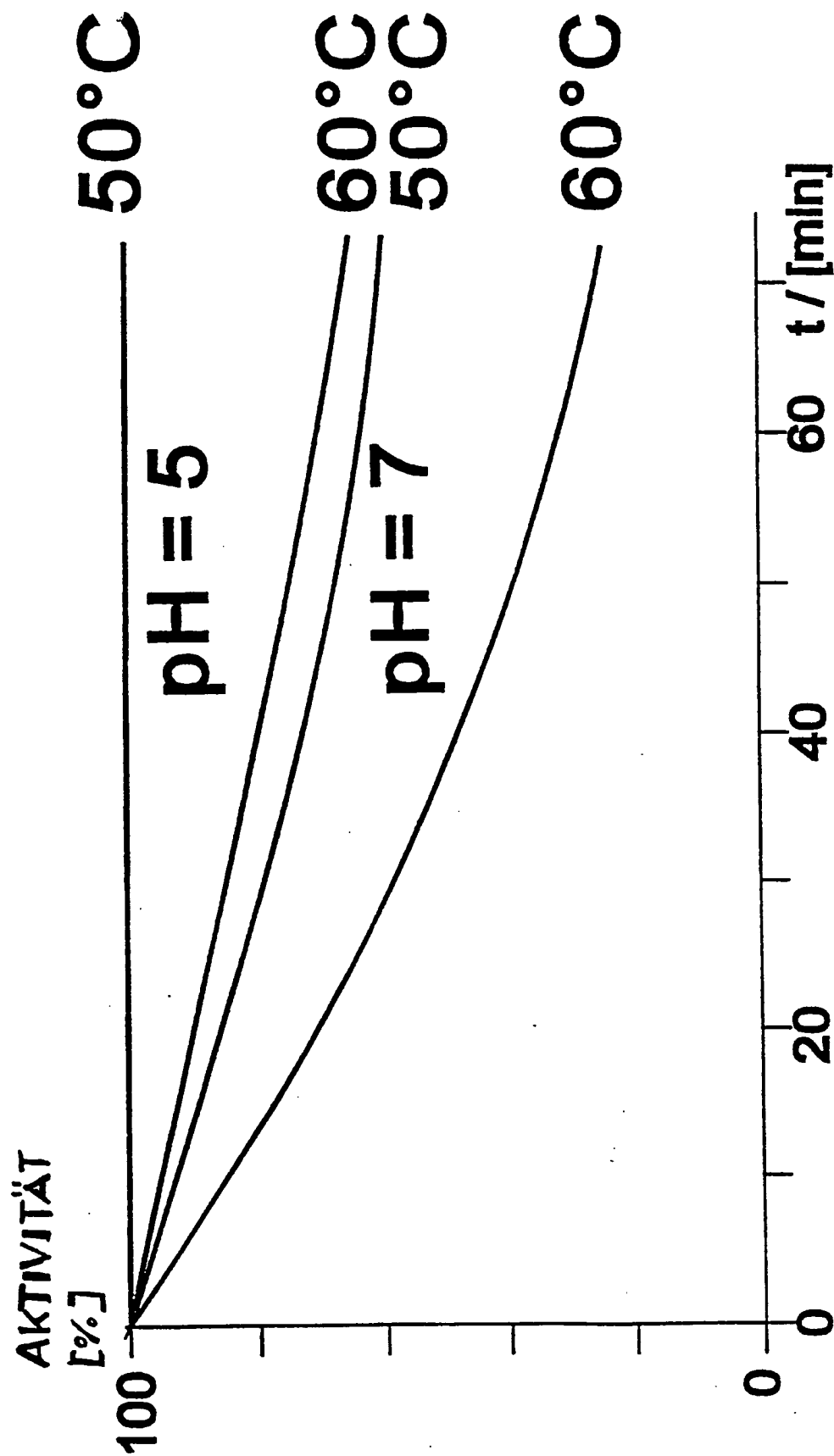
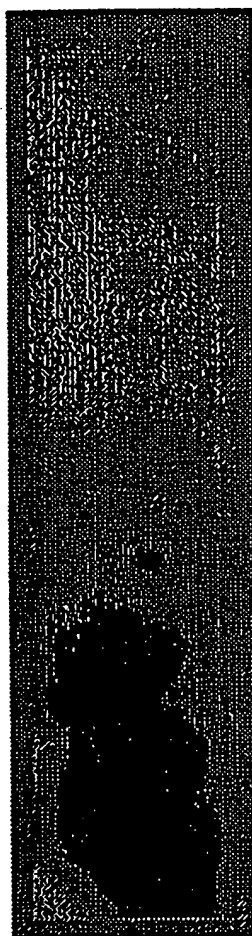
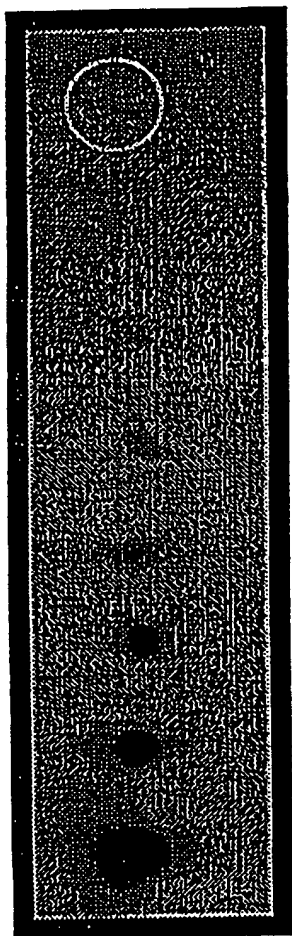


Abb. 2

Lipase

Alkal. Phosphatase



5 pg

10 pg

20 pg

100 pg

250 pg

500 pg

1 ng

10 ng

Abb. 3

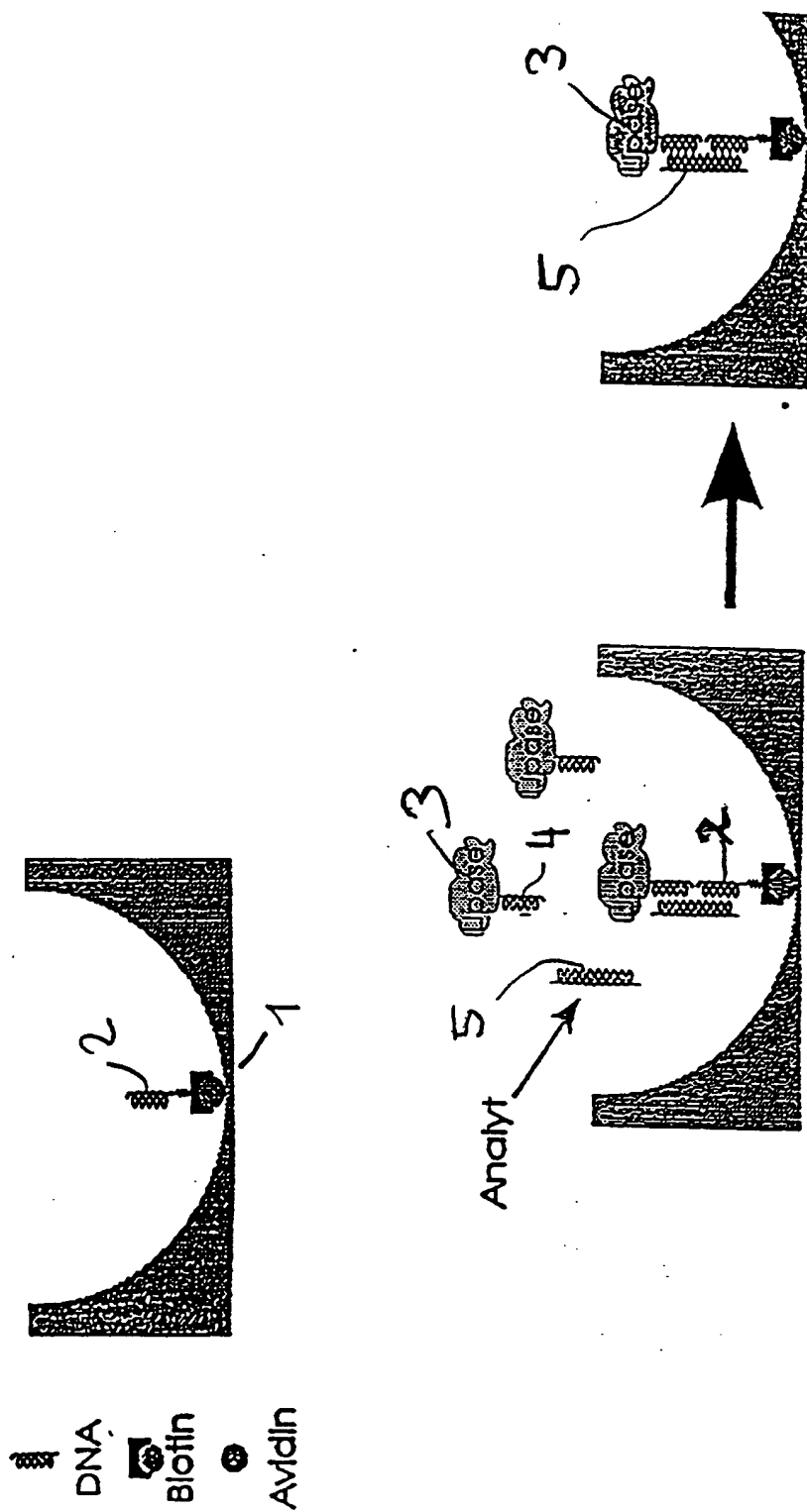


Abb. 4

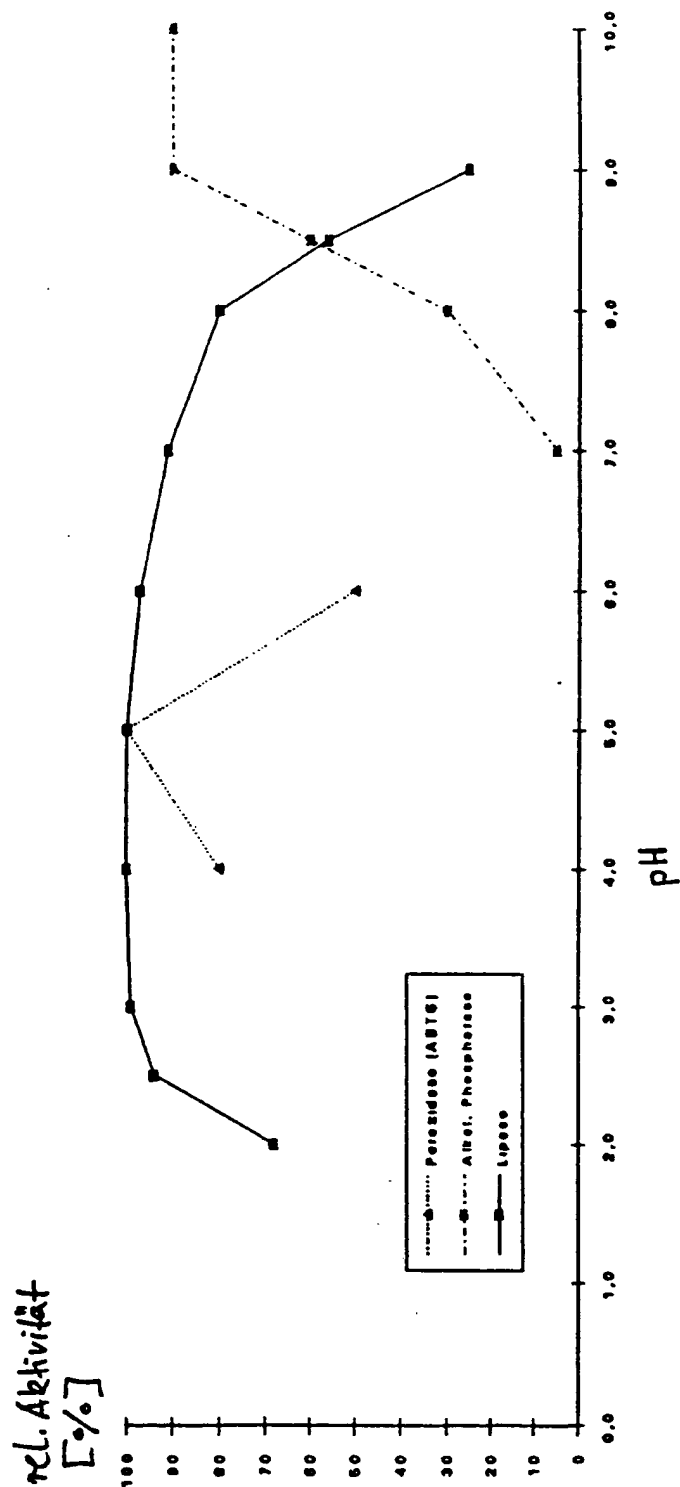
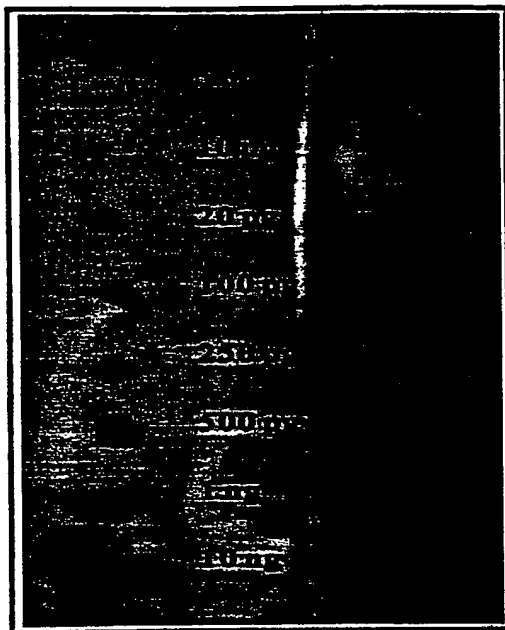


Abb. 5

Lipase **Alkal.**
Phosphatase



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 94/03379

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/535 G01N33/58 C12Q1/68 C12Q1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,92 21778 (LIFE TECHNOLOGIES, INC.) 10 December 1992 see page 3, line 16 - line 32 see page 8, line 4 - page 9, line 31 ---	1-6
Y	GENE, vol.124, no.1, 14 February 1993, AMSTERDAM NL pages 45 - 55 MARINA LOTTI ET AL. 'Cloning and analysis of Candida cylindracea lipase sequences' cited in the application see the whole document --- -/--	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 1995

Date of mailing of the international search report

13.03.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Döpfer, K-P

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol.54, no.5, May 1990, TOKYO JP pages 1253 - 1258 TARO IIZUMI; KOICHI NAKAMURA AND TETSURO FUKASE 'Purification of a Thermostable Lipase from Newly Isolated Pseudomonas sp. KWI-56' see the whole document in particular page 1257, right-hand column, lines 28-44	1,3,5,6
Y	EP,A,0 384 717 (MICHIGAN BIOTECHNOLOGY INSTITUTE) 29 August 1990 see page 2, line 1 - line 11 ---	1,3,4,6
Y	WO,A,86 03774 (CHR. HANSEN'S LABORATORIUM A/S) 3 July 1986 see claims 33-37 -----	1,3,4,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 94/03379

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9221778	10-12-92	US-A- 5248618	28-09-93
EP-A-0384717	29-08-90	US-A- 5093256	03-03-92
		JP-A- 2273178	07-11-90
		US-A- 5166069	24-11-92
WO-A-8603774	03-07-86	DE-A- 3585624	16-04-92
		EP-A, B 0205506	30-12-86

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N33/535 G01N33/58 C12Q1/68 C12Q1/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N C12Q C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO,A,92 21778 (LIFE TECHNOLOGIES, INC.) 10. Dezember 1992 siehe Seite 3, Zeile 16 - Zeile 32 siehe Seite 8, Zeile 4 - Seite 9, Zeile 31 ---	1-6
Y	GENE, Bd.124, Nr.1, 14. Februar 1993, AMSTERDAM NL Seiten 45 - 55 MARINA LOTTI ET AL. 'Cloning and analysis of Candida cylindracea lipase sequences' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- -/--	1-6

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nabeliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Februar 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

13.03.95

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Döpfer, K-P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd.54, Nr.5, Mai 1990, TOKYO JP Seiten 1253 - 1258 TARO IIZUMI; KOICHI NAKAMURA AND TETSURO FUKASE 'Purification of a Thermostable Lipase from Newly Isolated Pseudomonas sp. KWI-56' siehe das ganze Dokument siehe insbesondere Seite 1257, rechte Spalte, Zeilen 28-44 ---	1,3,5,6
Y	EP,A,0 384 717 (MICHIGAN BIOTECHNOLOGY INSTITUTE) 29. August 1990 siehe Seite 2, Zeile 1 - Zeile 11 ---	1,3,4,6
Y	WO,A,86 03774 (CHR. HANSEN'S LABORATORIUM A/S) 3. Juli 1986 siehe Ansprüche 33-37 -----	1,3,4,6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung..., die zur selben Patentfamilie gehören

Internr ales Aktenzeichen

PCT/EP 94/03379

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9221778	10-12-92	US-A- 5248618	28-09-93
EP-A-0384717	29-08-90	US-A- 5093256	03-03-92
		JP-A- 2273178	07-11-90
		US-A- 5166069	24-11-92
WO-A-8603774	03-07-86	DE-A- 3585624	16-04-92
		EP-A, B 0205506	30-12-86